

Vous travaillez sur une solution (X) purifiée d'hexokinase de foie de rat. La solution X ne contient que des protéines, vous avez mesuré la pureté de l'hexokinase à 50% dans cette solution. L'hexokinase est un homodimère de masse moléculaire 50 kDa.

Pour étudier l'activité enzymatique de la solution X vous disposez d'une cuve thermostatée de largeur 1 cm dans laquelle vous ajoutez : le réactif R1 290 μL (Tampon adapté, ATP et NADP en très large excès), le réactif R2 10 μL (glucose-6Phosphate déshydrogénase), la solution X 10 μL . Après 3 minutes de préincubation la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 μL d'une solution R3 de glucose.

On donne K_m de l'HK pour le Glc = 0.1 mM, ϵ_{NADPH} : $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, concentration en protéines totales de la solution X : 2g/L.

- 1) Ecrire la séquence réactionnelle. Quelle doit être la condition concernant l'activité enzymatique de la glucose-6Phosphate déshydrogénase.
- 2) On souhaite mesurer plus de 95% de l'activité enzymatique maximale de l'HK. Qu'elle doit être la concentration minimale de glucose dans R3

La lecture des densités optiques dans la cuve donne les résultats suivants

30 secondes 0.210

60 secondes 0.230

90 secondes 0.250

120 secondes 0.268

150 secondes 0.275

- 3) Calculer la concentration catalytique de la solution X en U/L
- 4) En déduire la concentration catalytique maximale de la solution X en katal/L
- 5) Calculer la valeur de la constante catalytique de l'HK.

Vous travaillez sur une solution (X) purifiée d'hexokinase de foie de rat. La solution X ne contient que des protéines, vous avez mesuré la pureté de l'hexokinase à 50% dans cette solution. L'hexokinase est un homodimère de masse moléculaire 50 kDa.

Pour étudier l'activité enzymatique de la solution X vous disposez d'une cuve thermostatée de largeur 1 cm dans laquelle vous ajoutez : le réactif R1 290 µL (Tampon adapté, ATP et NADP en très large excès), le réactif R2 10 µL (glucose-6Phosphate déshydrogénase), la solution X 10 µL. Après 3 minutes de préincubation la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 µL d'une solution R3 de glucose.

On donne K_m de l'HK pour le Glc = 0.1 mM, ϵ_{NADPH} : 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹, concentration en protéines totales de la solution X : 2 g/L

- 1) Ecrire la séquence réactionnelle. Quelle doit être la condition concernant l'activité enzymatique de la glucose-6Phosphate déshydrogénase

HK



G6PD



(5 pts pour les réactions)

La concentration catalytique de la G6PD doit être > à celle de l'HK pour ne pas être limitante (2 pts)

- 2) On souhaite mesurer plus de 95% de l'activité enzymatique maximale de l'HK. Quelle doit être la concentration minimale de glucose dans R3

$$V_o/V_m > 0.95 \text{ soit } \frac{n}{n+1} > 0.95 \quad 0.05n > 0.95 \quad n > 19$$

$$[\text{Glc}]_{\text{cuve}} > 19K_m \text{ soit } 1.9 \text{ mM et } [\text{Glc}]_{\text{R3}} = 1.9 * 330 / 20 = 31.35 \text{ mM}$$

(6 pts)

La lecture des densités optiques dans la cuve donne les résultats suivants

30 secondes	0.210
60 secondes	0.230
90 secondes	0.250
120 secondes	0.268
150 secondes	0.275

- 3) Calculer la concentration catalytique de la solution X en U/L

$$AE_{\text{sol X}} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon l} \times 10^6 \times \frac{\text{vol tot}}{\text{prise d'essai}} = \frac{0.04}{1} \times \frac{1}{6300 \times 1} \times 10^6 \times 33 = 209,52 \text{ U/L}$$

(9 pts)

- 4) En déduire la concentration catalytique maximale de la solution X en katal/L

$$V_{\text{max}} = 209.52/0.95 = 220,55 \text{ } \mu\text{mol/min/L}$$

$$\text{soit Conc Cat max} = 220,55/6 \cdot 10^7 = 3675,9 \text{ nkat/L}$$

(6 pts)

- 5) Calculer la valeur de la constante catalytique de l'HK.

$$V_{\text{max}} = K_{\text{cat}} \cdot [E]_{\text{tot}}$$

$$\text{Concentration de HK} = 1 \text{ g/L (50\% de pureté) soit } 1/50\,000 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$K_{\text{cat HK}} = 220.55 \times 10^{-6} / 2 \cdot 10^{-5} = 110.55 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$$

(8 pts)

note sur 36 points à adapter pour faire 40 points

court, pas de piège (attention pureté, et concentration dans R3 pour la q2)

demande de connaître les deux réactions de l'HK et de la G6PD